

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Direktor: Professor Dr. Klein

und

aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Immunologie Karlsruhe

Direktor: Professor Dr. Ringelmann

**UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DER SENSIBILITÄT UND
SPEZIFITÄT DES ANTIKÖRPERNACHWEISES DURCH TEILMECHANISIERUNG
EINZELNER SCHRITTE DER KOMPLEMENT-BINDUNGSREAKTION**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Albert A. Hartmann
aus Neustadt/Hardt

Mainz 1976

— —

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz

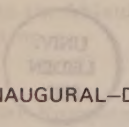
Direktor: Professor Dr. Klein

und

aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Immunologie Karlsruhe

Direktor: Professor Dr. Ringelmann

**UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DER SENSIBILITÄT UND
SPEZIFITÄT DES ANTIKÖRPERNACHWEISES DURCH TEILMECHANISIERUNG
EINZELNER SCHRITTE DER KOMPLEMENT-BINDUNGSREAKTION**


INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg Universität Mainz
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Albert A. Hartmann
aus Neustadt/Haardt

Mainz 1976

Fachbereichsdekan:

Prof. Dr.P.Klein

1. Gutachter:

Prof. Dr. R. Ringelmann,

2. Gutachter:

Prof. Dr. J. Berger,



INHALTSANGABE

	Seite
I. EINLEITUNG	2
1) Die Komplement-Bindungs-Reaktion und ihre Antigene	2
2) Die Anwendung der Komplement-Bindungsreaktion in der Lues-Serologie	3
3) Treponemen-spezifische Tests in der Lues-Serologie und ihre Bedeutung in der Lues-Diagnostik	5
II. ZIEL DER EIGENEN ARBEIT, MIT HINWEIS AUF BISHERIGE METHODEN DER AUTOMATISIERUNG DER KBR	9
III. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	11
IV. MATERIAL UND METHODIK	12
1) Beschreibung der Braun-Systematik und ihrer Einzelfunktionen im Ablauf der Komplement-Bindungs-Reaktion	12
2) Reagentien	12
3) Durchführung der Komplement-Bindungs-Reaktion mit Cardiolipin und Pallida als Antigen	12
V. ERGEBNISSE	13
1) Vergleich des Antikörpernachweises durch die Standard-Methode und durch die Braun-Systematik-Methode	13
2) Vergleichsbestimmung von Antikörper-Titern mittels beider Methoden	16

VI.	DISKUSSION	22
1)	Literaturübersicht zu ähnlichen Vergleichen zwischen Standard- und mechanisierter Methodik	22
2)	Beurteilung der Empfindlichkeit des Antikörper-nachweises beider Methoden	22
3)	Übersicht über die Bewertung des FTA-abs-Testes als Kriterium für die Einteilung der untersuchten Seren in biologisch falsch positive und in Lues positive Seren	23
4)	Beeinflussung der Spezifität des Antikörper-nachweises durch die Teilmechanisierung der Komplement-Bindungs-Reaktion	26
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	28
VIII.	LITERATUR	29
IX.	ANHANG	33
X.	LEBENS LAUF	39

I. EINLEITUNG

1. Die Komplement-Bindungs-Reaktion und ihre Antigene

Die Komplementbindungsreaktion ist eine indirekte Nachweisreaktion für Antikörper oder Antigene (Lit. 1). In der ersten Reaktionsstufe reagiert das Antigen mit dem entsprechenden homologen Antikörper; es bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe. In der zweiten Stufe wird dem Reaktionsgemisch eine dosierte Menge Komplement zugesetzt, das von den Antigen-Antikörper-Komplexen, auch Immunkomplexe genannt, gebunden wird. Da weder die Bildung des ersten Antigen-Antikörper-Komplexes, noch die Bindung des Komplements an den Immunkomplex direkt sichtbar sind, wird in der dritten Stufe mittels eines Indikatorsystems überprüft, ob die zugegebene Komplementmenge gebunden wurde oder noch frei verfügbar ist, wie in denjenigen Fällen, in denen das erste Reaktionsgemisch keinen Antikörper oder kein Antigen enthielt. Als Indikatorsystem für das nicht gebundene Komplement wird ein zweiter Immunkomplex eingesetzt, bestehend aus Hammelerythrozyten als Antigen und einen gegen das Forssman-Antigen ihrer Membran gerichteten Antikörper (Amboceptor vom Kaninchen); diese sensibilisierten Erythrozyten werden im folgenden als EA bezeichnet. Die zugesetzte Menge Komplement bindet sich an solche sensibilisierten Erythrozyten und führt nach einer Abfolge von neun Einzelreaktionen, bei denen die einzelnen Komponenten des Komplementsystems am Antikörper und der umgebenden Membran auf den Erythrozyten gebunden werden, zur Lyse der Erythrozyten (Lit. 14); das Ausmaß der Hämolyse ist auch ohne technische Hilfsmittel leicht mit dem Auge abschätzbar.

Auf die Kinetik der Bildungsreaktion für den Immunkomplex, der Bindung von Komplement an den Immunkomplex und die Kinetik der Lysereaktion der Erythrozyten soll nicht im einzelnen eingegangen werden

Ablauf der KBR

KBR: "negativ"

KBR: "positiv"

Serum ohne Anti-
körper

Serum mit Lues
induziertem Antikörper

+

Antigen (Treponemen,
Cardiolipin)

1. Stufe:

Bildung des Antigen-
Antikörper-Komplexes
(Immunkomplex)

Serum

Antigen

Antigen-Antikörper
(Immunkomplex)

+

2. Stufe:

Bindung von Complement
an den Immunkomplex

Complement
(C 1 - 9)

Serum

Antigen

Complement

Immunkomplex
mit C 1 - 9

3. Stufe:

Bindung von freiem
Complement an EA

+

Sensibilisierte
Erythrozyten EA

Serum

Antigen

Immunkomplex
mit C 1 - 9

EA C 1 - 9

EA

4. Stufe:

Lyse derjenigen EA-
Komplexe, die Com-
plement gebunden
haben

Lyse der Ery

keine Lyse der Ery

(Lit. 43). In der bisher als Standard-Methode durchgeführten KBR erfolgt die Bildung des Immunkomplexes als sogenannte Langzeit - oder Kältebindung nach Kolmer (Lit. 18): Das Antigen-Antikörpergemisch wird mit Komplement bei 4°C und 18 Stunden lang inkubiert und anschließend bei 37°C weitere 30 Minuten. Damit soll erreicht werden, daß Antikörper möglichst vollständig mit dem Antigen zu Immunkomplexen reagieren und alle komplementbindenden Immunglobulinmoleküle in den Komplexen Komplement anlagern können. Diese Kältebindung nach Kolmer führt zu einer Erhöhung der Sensibilität der KBR mit Reiter-Protein um 20 % und der Card-KBR gegenüber der Original-WAR um 28 % ohne Spezifitätsverlust (Lit. 3, 5, 34, 35).

Die Indikatorreaktion: Bindung des Komplements an Erythrozyten und Lyse der Erythrozyten wird hier als Endpunktreaktion durchgeführt, d. h. EA und das nicht durch Immunkomplexe aus der KBR Stufe 1 gebundene Komplement reagieren bei 37°C 30 bis 60 Minuten, nämlich so lange, daß alle C-Komponenten gebunden werden können und auf der Erythrozyten-Oberfläche bis zur Lyse weiter reagieren können (Lit. 14).

2. Die Anwendung der Komplement-Bindungs-Reaktion in der Lues-Serologie

Die Komplementbindungsreaktion wird sowohl zum Nachweis eines gesuchten Antikörpers im Patienten-Serum mit Hilfe eines bekannten Antigens, als auch zur Identifizierung eines unbekannten Antigens mittels eines bekannten spezifischen Antikörpers benutzt. Sie wird seit langer Zeit in der diagnostischen Serologie eingesetzt. Einer der ältesten Anwendungsbereiche ist die Suche nach luesspezifischen Antikörpern, die sogenannte Wassermann'sche Reaktion (WAR) (Lit. 44).

Als Antigen bei dieser Komplement-Bindungs-Reaktion wurden ursprünglich Extrakte aus der Leber von Totgeburten bei Lues connata eingesetzt.

Später zeigte sich, daß auch aus anderen Gewebeextrakten, z. B. aus Rinderherzextrakten, ein Antigen zum Nachweis von Antikörpern bei Treponemeninfizierten gewonnen werden kann. Das Lipid: Cardiolipin scheint das allen Extrakten gemeinsame Hapten zu sein (Lit. 31, 38). Der Antikörper gegen die Cardiolipin-Determinante kommt am häufigsten in Seren nach Treponemeninfektion vor: im Stadium II der Lues in 80 - 100 % der Fälle, im Stadium III der Lues in 50 - 100 % der Fälle (Angabebereiche bei verschiedenen Untersuchern - s. Tabelle S. 25). Diese unterschiedlichen Prozentangaben im gleichen Stadium haben ihre Ursache in der Feineinstellung der KBR, also höhere Sensibilität zu ungunsten der Spezifität oder umgekehrt, im Zeitpunkt der Blutentnahme im einzelnen Stadium und schließlich auch in der aktuellen Immunitätslage der mit *Treponema pallidum* infizierten Einzelpersonen.

Der Cardiolipin-Antikörper kommt auch bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen, sowie in der Schwangerschaft, in höherem Lebensalter, gelegentlich auch bei Gesunden vor (Lit. 8). Der Anteil dieser nicht luesspezifischen Antikörpernachweise, die auch als "biologisch falsch positive Reaktionen" (b.f.p.), besser aber als nichttreponemenspezifische Reaktionen bezeichnet werden, schwankt bei einzelnen Untersuchern zwischen 20 - 50 % (Lit. 8).

1929 führte Gaethgens (Lit. 11) ein Antigen aus Treponemen in die Lues-Diagnostik ein. Es wird gewonnen durch Ultraschallbehandlung des apathogenen ReiterSpirochaetenstammes, der auf unbelebten Nährsubstraten gezüchtet werden kann. Dieses Pallida-Antigen ist ein gruppenspezifisches Zellwandantigen, das sowohl in der Zellwand von *Treponema pallidum*, dem Erreger der Lues, aber auch in der Zellwand von apathogenen Spirochaeten, die in der physiologischen Flora menschlicher Schleimhäute vorhanden sind, vorkommt (Lit. 31). Antikörper gegen das Pallida-Antigen treten 4 - 6 Wochen nach Treponemen-Infek-

tion im Serum auf, sie finden sich im Stadium II der Lues in 60 - 100 %, im Stadium III in 75 - 100 % der Fälle (s. Tabelle S. 25).

Die wechselnden Prozentangaben werden bei verschiedenen Untersuchern gefunden. Bis zu 50 % der Pallida-Antikörper finden sich bei Patienten, die keine Treponema pallidum-Infektion durchgemacht haben (Lit. 8). Sowohl die KBR mit Cardiolipin- als auch die mit Pallida-Antigen ist als Suchreaktion auf Antikörper bei Lues-Patienten geeignet. Sie entdecken zwei verschiedene Antikörper im Ablauf der Infektion, die gegen verschiedene Antigene des Erregers gerichtet sind und die bei nahezu allen Infizierten vorkommen. Im Vergleich zu anderen Suchreaktionen sind sie sehr empfindlich und ihre experimentellen Parameter gut zu steuern. Die früher störende Unspezifität beider Reaktionen, d.h. der hohe Prozentsatz biologisch falsch positiver Reaktionen im Serum von Nichtinfizierten, kann heute durch eine Reihe empfindlicher treponemenspezifischer Tests geklärt werden.

3. Treponemen-spezifische Tests in der Lues-Serologie und ihre Bedeutung in der Lues-Diagnostik

Als Treponemen-spezifische Tests sind heute eingeführt:

Der Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper-Test (FTA-Test)

Er weist Antikörper im Patienten-Serum nach, die gegen ein Antigen gerichtet sind, das in der Zellwand des Treponema pallidum lokalisiert ist. Dieses Antigen ist nicht identisch mit dem Cardiolipin-Antigen oder Pallida-Antigen. Im FTA-Test werden formolininaktivierte Treponemata pallida des Nichols-Stammes, die auf lebenden Kaninchenhoden gezüchtet wurden, verwendet. Um die Reaktion der Antikörper mit den Treponemen sichtbar zu machen, beschichtet man den Ag-Ak-Komplex mit fluoresceinmarkiertem Antihumangammaglobulin, das mit dem Immunglobulin des Immunkomplexes Treponemen x Antigen - Treponemen x Antikörper reagiert (Lit. 7, 10, 15).

Der Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper-Absorptions-Test (FTA-abs-Test)

Untersuchungen ergaben, daß im FTA-Test nachzuweisende AK nicht einheitlich sind (Lit. 2). Die verschiedenen AK richten sich gegen verschiedene Antigene der Zellwand, sowohl gegen spezifische AK von *Treponema pallidum*, als auch gegen gruppenspezifische Antigene. Durch Absorption der gruppenspezifischen Antikörper aus dem Patienten-Serum mittels eines Adsorbens aus Reiter-Spirochaeten gelang eine Spezifitätssteigerung (Lit. 12, 19, 21, 27).

Der IgM-FTA-Test

Der IgM-FTA-Test ist ein Verfahren, zum fluoreszenzoptischen Nachweis treponemenspezifischer Immunglobuline der Gruppe M (IgM), welche als erste humorale Immunantwort auf eine Treponemeninfektion in niedrigen Titern nachweisbar sind. Die Immunglobuline der Klasse G (IgG) steigen demgegenüber verzögert (aber auf sehr hohe Titerwerte) an. Die IgM-Antikörper sind nicht plazentargängig (Lit. 9, 16, 37). Beim Neugeborenen nachgewiesene luesspezifische IgM-Antikörper sind also im Feten gebildet, d. h. es besteht eine Lues-connata des Kindes.

Der Treponema-Pallidum-Haemagglutinations-Test (TPHA-Test)

Fragmente aus *Treponema pallidum* sind an Erythrozyten adsorbiert. Der Antikörper des Patienten führt zu einer Agglutination der so vorbehandelten Erythrozyten (Lit. 12, 17, 22, 25, 26, 41).

Der Treponemen-Immobilisations-Test (TPI) oder Nelson-Test

weist AK nach, die sich gegen Antigene von *Treponema pallidum* richten, die für die aktive Beweglichkeit der Bakterien erforderlich sind. Der Antikörper der im FTA-Test nachgewiesen wird, ist einer der für die Immobilisation notwendigen Antikörper. Neben diesem ist ein zweiter Antikörper gegen ein anderes Antigen von *Treponema pallidum* sowie Komplement erforderlich (Lit. 2, 12, 20, 32, 36).

Die Bedeutung der Treponemenspezifischen Tests in der Lues-Serologie

A: Charakteristik

B: Einsatzmöglichkeiten

Der TPHA-Test,

A 1:

Treponema pallidum Haemagglutinations-Test, ist eine der frühest reaktiven spezifischen Lues-Seroreaktionen bei Infektion mit Treponema pallidum, zugleich mit dem FTA-abs-Test, dem IgM-FTA-Test sowie dem VDRL-Test reaktiv werdend (Lit. 17, 26, 34, 41).

A 2:

weist bis über 12 Jahre Titer auf, auch nach ausreichend behandelter Syphilis (Lit. 26).

B:

Einsatz als spezifische Suchreaktion auf eine einmal durchgemachte oder auf eine frische Lues-Erstinfektion (Lit. 17, 34). Durchführung in Routinelabors.

Der FTA-abs-Test:

Fluoreszenz-Treponemen-Antikörperabsorptions-Test

A 1:

ist eine gleichzeitig oder kurz nach dem TPHA-Test reaktiv werdende Lues-spezifische Sero-reaktion (Lit. 15, 26, 34).

A 2:

Titer sind auch nach ausreichend behandelter Syphilis noch Jahre nachweisbar; jedoch noch vor dem TPHA negativ werdend (Lit. 26, 37).

B:

Einsatz als spezifische Bestätigungsreaktion bei zweifelhaftem oder positivem TPHA-Test (Lit. 34).

Der IgM-FTA-Test:

Fluoreszenz Treponemen Immungammaglobulin-M-Antikörper-Test

- A 1: Bei Lues-Neuinfektion frühzeitiger Anstieg der spezifischen Immungammaglobuline der Klasse M (Lit. 37).
- A 2: Bei Lues connata des Neugeborenen Nachweis von spezifischen Immungammaglobulinen der Klasse M im Serum des Neugeborenen (Lit. 16).
- B 1: Einsatz als Bestätigungsreaktion für eine Neuinfektion mit *Treponema pallidum* bei noch reaktivem TPHA-, FTA-abs-, sowie Nelson-Test nach ausreichend behandelter Lues (Lit. 37).
- B 2: Einsatz zur Frage der weiteren Behandlungsbedürftigkeit nach einer Lues-Therapieserie (Lit. 33, 37).
- B 3: Einsatz zum Nachweis oder Ausschluß einer Lues connata des Neugeborenen bei lueskranker Mutter (Lit. 16).
Durchführung in Speziallaboratorien.

Der Nelson-Test: *Treponema pallidum* Immobilisations-Test, TPI

- A 1: spätest reaktiv werdender Lues-spezifischer Test (Lit. 34).
- A 2: relativ früh fallende Titer der spezifischen Tests nach ausreichend behandelter Syphilis (Lit. 34).
- B 1: Einsatz bei differierenden Ergebnissen des TPHA- und des FTA-abs-Testes (Lit. 34).
- B 2: als weitere Bestätigungs-Reaktion bei Lues-latens (Lit. 34).
Durchführung in Speziallaboratorien.

Trotz der differenzierten Aussagefähigkeit dieser Lues-spezifischen Seroreaktionen kommt dem Titerverlauf der nicht treponemenspezifischen Antikörper, VDRL-Test = CMT u. ä. und Cardiolipin-Komplement-Bindungsreaktion wegen ihres raschen Titerabfalles nach ausreichend behandelter Lues auch heute noch große Bedeutung in der Diagnostik und Therapie-Kontrolle bei Infektionen mit *Treponema pallidum* zu (Lit. 26, 34).

II. ZIEL DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

Stimuliert durch die großen Erfolge der Teilmechanisierung und Automatisierung vor allem in der klinisch-chemischen Analytik, steht heute eine Vielzahl verschiedener Möglichkeiten zur Mechanisierung auch serologischer Reaktionen zur Verfügung (Lit. 3). Es handelt sich einmal um eine Miniaturisierung der serologischen Reaktionen mit Hilfe der Mikrotiter-Technik, zum anderen um die Adaptation der kontinuierlichen Analysentechnik mittels der Auto-Technicon-Geräte (Lit. 23, 39, 40, 43) und zum dritten um den Einsatz von verschiedenen Geräten der diskontinuierlichen Analysenmechanik (Lit. 5, 13).

Um ein solches Gerät der diskontinuierlichen Analysen-Methode handelt es sich bei der in dieser Studie adaptierten "Braun-Systematik". Hier werden getrennte Einzelteile zur Mechanisierung verschiedener Einzelschritte der Reaktion eingesetzt: zum Verdünnen der Seren, zur Zugabe der Reagentien: Antigen, Komplement und Erythrozyten, zur kontrollierten Inkubation sowie zur fotometrischen Messung der Extinktion oder Trübung und zum Ausdrucken der Werte. Auf diese Weise wird ein rationeller Einsatz der Einzelbausteine ermöglicht. Dabei wurde erwartet, daß größere Präzision und höhere Reproduzierbarkeit der Tests sowie Einsparung von Reagentien und Reduzierung der Arbeitsbelastung für qualifizierte Med.-Techn. Assistentinnen und eine verbesserte Dokumentation der Reaktionsergebnisse erreicht werden kann.

Im ersten Teil der Untersuchung wurde eine parallele Vergleichsbestimmung an 1239 Patienten-Seren durchgeführt, um den Einfluß der Teilmechanisierung auf die Empfindlichkeit (Sensibilität) des Antikörper-Nachweises zu überprüfen: die KBR wurde mit gleichen Reagenzien einmal mit dem Standardverfahren der Routinediagnostik, im folgenden als Standardmethode (StM) bezeichnet, und andererseits mit dem automatischen Analysengerät "Braun-Systematik" (BSM) auf Antikörper gegen Cardiolipin-Antigen und Pallida-Antigen durchgeführt; lediglich die Volumina wurden aus technischen Gründen bei der BSM verdoppelt.

Im zweiten Teil wurde an einzelnen positiven Seren eine Titerbestimmung mittels beider Methoden durchgeführt, mit der Frage nach der Empfindlichkeit des Antikörpertiter-Nachweises mittels der mechanisierten Methode.

Im dritten Teil wurde schließlich versucht, den Einfluß der Teilmechanisierung auf die Spezifität des Antikörper-Nachweises zu überprüfen.

Hierzu wurden die Seren in zwei Gruppen aufgeteilt: in solche, die nach dem Ausfall der luesspezifischen Seroteste; FTA 100-200 und dem FTA-abs, in manchen Fällen zusätzlich nach dem Ergebnis des TPI sowie nach klinisch-anamnestischen Angaben mit hoher Wahrscheinlichkeit von Lues-infizierten Patienten stammten und in diejenigen Seren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine biologisch falsch positive Reaktion zeigten, die also keine *Treponema pallidum* spezifischen Antikörper enthielten.

III. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Abkürzungen zur Komplement-Bindungs-Reaktion: KBR

AG	Antigen
AK	Antikörper
IK	Immunkomplex
b.f.p.	biologisch falsch positiv
Car	Cardiolipin
EA	Erythrozyten-Ambozeptor-Komplex
Pal	Pallida

Abkürzungen für Teste

FTA 100/200	Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper-Test in der Serumverdünnung 1:100 und 1: 200
FTA-abs-Test	Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper-Test nach Absorption des Serums
IgM-FTA	IgM-Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper-Test
KBR	Komplement- Bindungs-Reaktion
VDRL	Venereal Disease research Laboratory-Test
CMT	Cardiolipin-Mikroflockungstest
TPHA	Treponema pallidum Hämagglutinations-Test
TPI	Treponema pallidum Immobilisations-Test = Nelson-Test

Abkürzungen zum technischen Teil

BS	Braun-Systematik
DE	Dilustatik-Einheit
IE	Inkubations-Einheit
TE	Transferrier-Einheit
StM	KBR durchgeführt mit der Standard-Methode
BSM	KBR durchgeführt mit der Braun-Systematik

IV. MATERIAL UND METHODIK

1. Beschreibung der Braun-Systematik und ihrer Einzelfunktionen im Ablauf der Komplement-Bindungs-Reaktion

Die "Braun-Systematik", ein Gerät der diskontinuierlichen Analysenautomatik, besteht aus Einzelteilen, die beliebig angeordnet und verwendet werden können.

Die Dilustatik-Einheit (DE) kann zum Ansaugen, Pipettieren und gleichzeitigen Verdünnen von Serum-Proben und Reagentien verwendet werden; die Transferrier-Einheit (TE) übernimmt die Übertragung der Patienten-Seren aus den Proben-Röhrchen in die Reaktionsgefäße der Inkubationseinheit (IE). In dieser findet die Inkubation des Serum-Ag-C'-EA-Gemisches für 30 Minuten bei 37⁰ statt und von hier wird das Reaktionsgemisch über einen Entnahmekopf abgesaugt und in das Photometer zur Trübungsmessung weitergeleitet. Die numerisch angezeigte photometrische Messung wird dann mit Datum, Platzcodierung und Meßergebnis vom Rechner ausgedruckt.

Die sogenannte Kälte-Bindung bei 4⁰C und 18 Stunden findet außerhalb der Braun-Systematik im Kühlschrank statt.

2. Reagentien (siehe Anhang)
3. Durchführung der Komplement-Bindungs-Reaktion mit Cardiolipin und Pallida als Antigen (siehe Anhang)

V. ERGEBNISSE

1. Vergleich des Antikörpernachweises durch die Standard-Methode und durch die Braun-Systematik-Methode

In einer Serie von 1239 Patienten-Seren wurde der Antikörper gegen Car-Ag und Pal-Ag mittels StM und BSM gleichzeitig in parallelen Ansätzen bestimmt. Die StM wurde so durchgeführt, wie sie im diagnostischen Labor als Routinemethode eingeführt ist. Die automatisierte Methode mittels BSM ist unter Material und Methodik beschrieben. Es wurden in beiden Methoden gleiche Reagentien verwendet.

Die Tabellen 1a und 1b zeigen die Ergebnisse dieses Methodenvergleiches, getrennt aufgeführt für das Car- und das Pal-Antigen.

In Tabelle 1a sind die AK-Bestimmungen gegen das Car-Ag dargestellt, es waren:

33 Patienten-Seren concordant reaktiv in StM und BSM

1157 Patienten-Seren concordant nicht reaktiv in StM und BSM

1,6% der in der StM reaktiven Patienten-Seren waren in BSM nicht reaktiv
umgekehrt waren 2,2% der in BSM reaktiven Seren in StM nicht reaktiv.

Zur statistischen Auswertung wurde die Co-Positivität der BSM mit der StM, als der Prozentsatz der in beiden Methoden concordant reaktiven Seren, im Verhältnis zur Gesamtzahl der in StM reaktiven Seren errechnet.

Analog ist die Co-Negativität der BSM mit der StM der Prozentsatz der in beiden Methoden übereinstimmend nicht reaktiven Patienten-Seren zur Gesamtzahl der in StM nicht reaktiven Seren.

		Mechanisierete Methode		BSM
		+	-	
Bisherige Methode (StM)	+	a	b	a + b
	-	c	d	c + d
				a + b + c + d

$$\text{Co-Positivität} = \left(\frac{a}{a + b} \right) \cdot 100$$

(mit der bisherigen Methode)

$$\text{Co-Negativität} = \left(\frac{d}{c + d} \right) \cdot 100$$

(mit der bisherigen Methode)

$$\text{Übereinstimmung} = \left(\frac{a + d}{a + b + c + d} \right) \cdot 100$$

Tabelle 1 a

Vergleich der Reaktionsergebnisse mittels StM und BSM bei 2478 parallel durchgeführten AK-Bestimmungen gegen Car-Ag in 1239 Probanden-Seren.

		BSM		Σ d. Seren		
		+	-			
StM	+	33	21	54	Übereinstimmung	97 %
					Co-Positivität	61 %
	-	28	1157	1185	Co-Negativität	97 %
Σ		61	1178	1239		

Rating Index: + 0,5875

Standardabweichung
 $\pm 0,0665$

95 % Vertrauensgrenze 0,4572 $\longleftrightarrow$ 0,7178

Die Co-Positivität und Co-Negativität beträgt 100 % bei identischen Reaktionsergebnissen in beiden Methoden. Die Co-Positivität zwischen StM und BSM für das Car-Ag beträgt hier 61 %. Auf die Bedeutung dieser Abweichung wird später eingegangen.

Die Berechnung der Übereinstimmung der Reaktionsergebnisse, die mittels StM und BSM erhalten wurden, ergibt zwar generell einen höheren Prozentsatz an übereinstimmenden Ergebnissen (für das Car-Ag 97 % und für das Pal-Ag 89 %), gestattet jedoch nicht die Beurteilung der Frage, ob die mechanisierte Methode gegenüber der Standardmethode gleiche oder unterschiedliche Empfindlichkeit hat.

Der Rating-Index gibt Auskunft über die Höhe der in StM und BSM übereinstimmenden Ergebnisse und kann Werte von + 1,0 bis - 1,0 annehmen. Ein Rating-Index von + 1,0 bedeutet: alle Ergebnisse beider Methoden stimmen überein; ein Rating-Index von - 1,0 bedeutet: kein Ergebnis der StM stimmt mit dem der BSM überein.

Die Tabelle 1 b zeigt die Ergebnisse der parallel durchgeführten Antikörperbestimmung für das Pal-Ag: es ergab ähnliche Werte; lediglich der Anteil der in StM isoliert reaktiven (4,1 %) und der in BSM isoliert reaktiven (6,6 %) Seren war gering höher als bei der Vergleichsuntersuchung mit Car-Ag.

Tabelle 1 b

Vergleich der Reaktionsergebnisse mittels StM und BSM bei 2478 parallel durchgeführten AK-Bestimmungen gegen Pal-Ag in 1239 Probanden-Seren.

		BSM		d. Seren	
		+	-		
StM	+	92	51	143	Übereinstimmung 89 %
	-	82	1014	1096	Co-Positivität 64 % Co-Negativität 92 %
d. Seren		174	1065	1239	
					Standardabweichung
Rating-Index: + 0,5685					+ 0,0408
95 % Vertrauensgrenze 0,4885					↔ 0,6486

2. Vergleichsbestimmung von Antikörper-Titern mittels beider Methoden

Zur Frage der unterschiedlichen Empfindlichkeit der beiden technischen Modifikationen wurden vergleichende Bestimmungen des AK-Titers bei 80 Pal- und Car-Ag reaktiven Seren mittels der Kolmer-Technik vorgenommen:

- 78 Seren zeigten in StM einen niedrigeren,
- 5 Seren einen gleich hohen Titer, bei
- 2 Seren wurde dagegen mittels der StM ein höherer Titer

festgestellt als in der BSM. Der Titerunterschied zwischen StM und BSM betrug durchschnittlich eine Titerstufe.

Sowohl die vergleichende Bestimmung der Titerhöhe als auch die Beobachtung, daß 7 % aller untersuchten Patienten-Seren nur in BSM reaktiv waren gegenüber 4 %, die nur in StM anzeigten, sind ein erster Hinweis dafür, daß durch die Teilmechanisierung der KBR eine höhere Konstanz der Reaktionsbedingungen und damit eine höhere Empfindlichkeit erzielt wurde. Eine Erklärung hierfür kann in einer Reduzierung von technischen Fehlern, wie Pipettier- und Ablesefehlern und in einer größeren Konstanz und Reproduzierbarkeit der Inkubationsbedingungen liegen (Lit. 3).

Untersuchungen zur Beeinflussung der Sensibilität und der Spezifität der KBR durch die Anwendung der Braun-Systematik

Sensibilität bedeutet, daß ein Test positiv ausfällt, wenn die Krankheit besteht (hier Lues) und Spezifität, daß ein Test negativ ausfällt, wenn die Krankheit nicht vorliegt. Abweichend zu dieser Definition steht allerdings oft der Sprachgebrauch im Serologischen Labor, oft auch in der Literatur: Alle positiven Reaktionsausfälle werden der Sensibilität der Methode zugerechnet. Unter allen positiven Reaktionen werden als "spezifische Reaktion" dann diejenigen zusammengefaßt, die nur bei den Kranken, das sind im vorliegenden Fall die Treponemeninfizierten, vorliegen.

Zur Frage der Sensibilität und Spezifität der in beiden Methoden festgestellten Reaktionen in der KBR mit Pallida bzw. Cardiolipin Antigen wurde das FTA-abs-Test-Ergebnis von 1186 in FTA-abs-Test untersuchten Patientenseren zugrunde gelegt.

Auf die Frage der Verlässlichkeit dieses Testergebnisses als Grundlage der Einteilung in Treponemen spezifische und b.f.p.-Seren wird später eingegangen.

Tabelle 2 a zeigt 96 FTA-abs reaktive Seren = Seren von an Lues erkrankten Patienten und ihre Reaktion in der KBR mit Pallida und Cardiolipin Antigen mittels beider Methoden.

Tabelle 2

Vergleich des AK-Musters in der selektionierten Gruppe - 96 FTA-abs-reaktive Seren - auf Concordanz der Ergebnisse in StM und BSM

2 a		BSM				Σ
		Pal - Car +	Pal + Car -	Pal + Car +	Pal - Car -	
StM ↓	Pal - Car +	0	0	0	0	0
	Pal + Car -	0	26	3	6 !	35 6 ! nur StM reaktiv
	Pal + Car +	0	4	21	0	25
	Pal - Car -	2 !!	16 !!	1 !!	17	36 19 !! nur BSM reaktiv
	Σ	2	46	25	23	96

n = 1186 $\begin{matrix} \nearrow 96 \\ \searrow 1090 \end{matrix}$

Vergleich des AK-Musters in der selektionierten Gruppe - 1090 FTA-abs nicht reaktive Seren - auf Concordanz der Ergebnisse in StM u. BSM

2 b		BSM				Σ
		Pal - Car +	Pal + Car -	Pal + Car +	Pal - Car -	
StM ↓	Pal - Car +	1	0	1	7 !	9
	Pal + Car -	1	0	5	32 !	38 47 ! nur StM b.f.p.
	Pal + Car +	3	1	6	8 !	18
	Pal - Car -	3 !!	25 !!	0	997	1025 28 !! nur BSM b.f.p.
	Σ	8	26	12	1044	1090

In gleicher Weise dargestellt sind in Tab. 2 b 1090 im FTA-abs-Test nicht reaktive Patientenseren (= nicht an Lues erkrankte Patienten).

Von 96 FTA-abs-Test positiven Seren zeigten (links oben nach rechts unten):

64 (dies ist die Summe der diagonalen Felder) in beiden Methoden gleiches Reaktionsmuster, bei

19 Seren (unterste Zeile ohne Feld rechts außen) konnte nur mit der BSM ein Antikörper-Nachweis geführt werden, bei

6 Seren (letzte Reihe ohne unterstes Feld) dagegen nur mit der StM.

Dagegen waren von 1090 FTA-abs-negativen Seren, also b.f.p.-Seren zwar:

28 ausschließlich mittels BSM reaktiv (unterste Zeile ohne Feld rechts außen), aber

47 ausschließlich mittels StM reaktiv (letzte Reihe ohne unterstes Feld).

Die Abweichung identischer Antikörpernachweise mittels StM und BSM betrug demnach bei Lues-Seren 33 %, bei Seren von nicht an Lues erkrankten Personen 7,9 %.

Tabelle 3 a

Vergleich der Sensibilität und der Spezifität der Cardiolipin-Antikörper-Nachweise im Serum der mittels StM und der mittels BSM untersuchten Patientenseren anhand von 96 im FTA-abs-Test positiven - und 1090 im FTA-abs-Test negativen Seren (Prozentangaben in Klammern).

		<u>Cardiolipin-Antigen</u>			
		+	StM	-	
FTA abs	pos.	Sensibilität 25 (26 %)			96
	neg.				1090
		Spezifität 1063 (97,5 %)			
		+	BSM	-	
FTA abs	pos.	Sensibilität 27 (28 %)			96
	neg.				1090
		Spezifität 1070 (98,2 %)			

Tabelle 3 b

Vergleich der Sensibilität und der Spezifität der Pallida-Antikörper-Nachweise im Serum der mittels StM und der mittels BSM untersuchten Patientenseren anhand von 96 im FTA-abs-Test positiven - und 1090 im FTA-abs-Test negativen Seren (Prozentangaben in Klammern).

		<u>Pallida-Antigen</u>			
		+	StM	-	
FTA abs	pos.	Sensibilität 60 (62 %)			96
	neg.				1090
		Spezifität 1034 (94,9 %)			
		+	BSM	-	
FTA abs	pos.	Sensibilität 71 (74 %)			96
	neg.				1090
		Spezifität 1052 (96,5 %)			

Bei der Untersuchung der Sensibilität und der Spezifität des Antikörper-nachweises mittels beider Methoden - BSM und StM - ergaben sich:

für die KBR mit Cardiolipin Antigen (Tab. 3 a):

26 % Sensibilität bei der KBR mittels StM
 gegenüber

28 % Sensibilität bei der KBR mittels BSM

also eine um 2 % höhere Sensibilität gegenüber der StM
und

97,5 % Spezifität bei der KBR mittels StM
 gegenüber

98,2 % Spezifität bei der KBR mittels BSM

also etwa gleicher Spezifität.

für die KBR mit Pallida Antigen (Tab. 3 b):

62 % Sensibilität bei der KBR mittels StM
 gegenüber

74 % Sensibilität bei der KBR mittels BSM

also eine um 12 % höhere Sensibilität gegenüber der StM
und

94,9 % Spezifität bei der KBR mittels StM
 gegenüber

96,5 % Spezifität bei der KBR mittels BSM

also einer gering höheren Spezifität der BSM.

Insgesamt wurden mittels der BSM mehr Car- und Pal-AK in Lues-Se-
ren nachgewiesen als mit der StM; die StM weist mehr falsch ne-
gative Komplementbindungsreaktionen auf.

Ferner ergab die StM häufiger solche AK-Nachweise, die als b.f.p.
eingestuft werden mußten.

VI. DISKUSSION

1. Literaturübersicht zu ähnlichen Vergleichen zwischen Standard- und mechanisierter Methodik

Vergleichsuntersuchungen anderer Autoren über den Einfluß der Mechanisierung der klassischen Lues-serologischen Reaktionen auf ihre Empfindlichkeit kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie die vorliegende Reihe: Die Übereinstimmung von 15.560 im Automated Reagin-Test und im VDRL-Test untersuchten Seren betrug 98,3 %, die - aus den experimentellen Daten nach der hier angewendeten Auswertungsmethode errechnete - Co-Positivität zwischen VDRL-Test und ART beträgt 86 %, die Co-Negativität 99,5 %. Bei FTA positiven Seren war der ART in 89,6 %, der VDRL in 85,3 % der Seren reaktiv (Lit. 28). Von 250 mit Hilfe des Autoanalyzers mit dem Reiter-Protein-Complement-fixation-Test untersuchten Seren waren 6 falsch positiv (1,5 %) und 9 falsch negativ (2,3 %) (Lit. 40). Ein Titervergleich zwischen ART und VDRL ergab bei 34,3 % gleiche Titer in beiden Methoden und bei 53 % höhere Titer mittels des ART (Lit. 29).

2. Beurteilung der Empfindlichkeit des Antikörpernachweises beider Methoden

Die Beurteilung der Empfindlichkeit des Antikörpernachweises der KBR mittels Standardmethode und Braun-Systematik-Methode (Tab. 1a und 1b) ergab:

eine Übereinstimmung beider Untersuchungstechniken für das Car-Ag von 96 %, für das Pal-Ag von 89 %, auch die Co-Negativität mit 97 % für das Car-Ag und 92 % für das Pal-Ag waren den für andere Lues-serologische Tests beschriebenen Untersuchungsergebnissen vergleichbar. Lediglich die Co-Positivität (Car-Ag 61 % und Pal-Ag 64 %) liegt deutlich niedriger als die Co-Positivität bei dem Vergleichstest zwischen VDRL und ART von 86 %.

Die Co-Negativität zwischen den beiden technischen Varianten StM und BSM ist hoch, die Co-Positivität beträgt aber nur 61 %. Dies könnte erklärt werden durch höhere Empfindlichkeit des AK-Nachweises und größere Stabilität einer der beiden Methoden (Lit. 3). Die Detailanalyse der Ergebnisse des Vergleiches deutet auf eine Verbesserung der Nachweisgrenze durch teilautomatische Durchführung hin: In der StM allein gelang in 1,6 % bei Car und in 4,1 % bei Pal ein AK-Nachweis, hingegen in der BSM allein bei 2,2 % bei Car und 6,2 % bei Pal.

Vergleicht man nicht das Testergebnis gegen ein isoliertes Antigen, sondern das Reaktionsmuster des einzelnen Patienten-Serums gegen Car und Pal gemeinsam, so ergeben sich folgende Beobachtungen: StM allein erkennt 53 Seren (6 Lues und 47 b.f.p. Seren), BSM allein 47 Seren (19 Lues und 28 b.f.p. Seren) als reaktiv (Tab. 3a/b). Wenn aber zur Beurteilung der Spezifität des Reaktionsergebnisses die Seren in Lues-Seren und b.f.p.-Seren getrennt werden, dann sind also von den Lues-spezifischen Seren nur 6 allein mittels der StM, dagegen 19 allein mit der BSM nachgewiesen worden. Auf die Grundlage der Einteilung in Lues- und b.f.p.-Seren wird im folgenden eingegangen.

3. Übersicht über die Bewertung des FTA-abs-Testes als Kriterium für die Einteilung der untersuchten Seren in biologisch falsch positive und in Lues-positive Seren

Hierzu wurden die Angaben der Literatur zur Übereinstimmung von Treponemen-spezifischen Tests (FTA, TPI, TPHA) mit den klinisch gesicherten verschiedenen Stadien der Lues-Erkrankung zusammengestellt (siehe Tabelle 4). In dieser Tabelle sind die Angaben der Autoren zur Reaktivität der angeführten Lues-Seroreaktionen in den einzelnen Stadien der Lues nach Riccord, 1832, (8) und den Sonderformen Lues-connata und Neurolues tabellarisch aufgeführt.

Unterteilt wurden die Angaben in Seren von Patienten mit behandelter (b) und unbehandelter (k) Lues. Die Zahlenangaben sind Prozentangaben der in dem jeweiligen Stadium und der jeweiligen Seroreaktion reaktiven Patienten-Seren mehrerer, von verschiedenen Autoren untersuchter Kollektive.

Die Angabe "von - bis" gibt den jeweils niedrigsten und jeweils höchsten angegebenen Prozentsatz reaktiver Seren eines Stadiums wieder.

(Mögliche Ursachen dieser unterschiedlichen Prozentangaben in den einzelnen Stadien siehe vorn unter: die KBR in der Lues-Diagnostik).

Die zusammengestellten Werte der Literatur rechtfertigen demnach die Aufteilung der Seren auf der Basis des Reaktionsausfalls in dem Treponemen-spezifischen FTA-abs-Test zur Beurteilung der Spezifität der nicht lues-spezifischen Suchteste, also in unserem Fall der Antikörperbestimmung gegen Cardiolipin und Pallida.

Trotzdem kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß in der Gruppe der FTA-abs-positiven Seren noch das eine oder andere b. f. p. -Serum enthalten ist und umgekehrt ein Lues-Serum der Gruppe der b. f. p. -Seren zugeordnet wurde.

Tabelle 4

Übersicht über den Anteil positiver Reaktionen serologischer Lues-Teste in Prozent bei verschiedenen Untersuchern

Nr. der Literaturangabe	Lues-serologische Tests	Bereich der Lit.-angabe	Lues I	Lues II	Lues latens	Lues connata	Lues III	Neuro-Lues
17, 22, 24, 26	TPHA	k von - bis	50 - 96	95 - 100	94 - 100	80 - 100	100	-
		b von - bis	94	70 - 100	72 - 100	-	52	-
9, 19	FTA ₂₀₀	k von - bis	100	100	100	100	100	100
		b von - bis	38 - 76	82 - 84	73 - 100	64 - 89	77 - 100	88 - 100
6, 9, 15, 17, 19, 24, 26, 27, 30	FTA _{abs}	k von - bis	40 - 100	91 - 100	67 - 100	91 - 100	50 - 100	100
		b von - bis	50 - 94	61 - 100	72 - 97	100	72 - 100	100
4, 9, 15, 17, 19, 27, 30	TPI	k von - bis	0 - 67	33 - 100	55 - 100	50 - 100	60 - 100	84 - 100
		b von - bis	0 - 83	40 - 92	54 - 98	64 - 100	59 - 100	73 - 100
4	Pal KBR	k von - bis	66 - 100	66 - 100	61 - 94	55 - 100	75 - 100	66 - 100
		b von - bis	12 - 100	20 - 80	39 - 80	21 - 63	49 - 75	25 - 84
4	Car KBR	k von - bis	10 - 100	82 - 100	35 - 95	25 - 100	54 - 100	51 - 100
		b von - bis	0 - 40	15 - 52	50 - 73	54 - 100	54 - 82	61 - 76
4, 26 27, 42	VDRL u. ähnl.	k von - bis	52 - 77	93 - 100	15 - 95	88	66 - 84	-
		b von - bis	88	100	69	-	90	-

4. Beeinflussung der Spezifität des Antikörper-Nachweises durch die Teilmechanisierung der Komplement-Bindungs-Reaktion

Die Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse beider Methoden gegen Cardiolipin-Antigen ergibt für die Gruppe der FTA-abs-positiven Seren eine Co-Positivität von 84 % gegenüber 61 % bei der nicht selektionierten Gesamtzahl der Seren und von 40 % in der Gruppe der FTA-abs-negativen Seren.

Die entsprechenden Werte für das Pallida-Antigen sind: Co-Positivität in den FTA-abs-positiven Seren 90 %, bei der nicht selektionierten Gesamtzahl 64 %, bei FTA-abs-negativen Seren 53 %.

Der Prozentsatz der in der BSM negativen Seren (in Tab. 1a und 1b) betrug 4,1 % gegenüber 6,2 % der in StM negativen Seren im Falle des Cardiolipin-Antigens und beim Pallida-Antigen 6,2 % bei der BSM bzw. 17,6 % bei der StM.

Bei der Beurteilung des Reaktionsmusters der einzelnen Patienten-Seren (Tab. 3) gegen beide Antigene wird ein ähnliches Ergebnis sichtbar: In der Gruppe der FTA-abs-positiven Seren zeigen beide technischen Varianten in 64 von 96 Seren gleiches Reaktionsmuster, die BSM weist bei 6 FTA-abs-reaktiven Seren keinen, die StM bei 19 FTA-abs-reaktiven Seren keinen Antikörper nach, bei denen jeweils die andere Methode einen Antikörperrnachweis erbrachte.

Diese Analyse zeigt also, daß durch die Automatisierung nicht nur eine Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit erzielt werden kann, sondern daß darüber hinaus häufiger lues-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die Beobachtung, daß in nicht allen FTA-abs-positiven Seren (17 Seren) Antikörper gegen Cardiolipin oder Pallida nachgewiesen werden, wird erklärt durch die Tatsache, daß wir nicht über die Angabe des Stadiums der Erkrankung bei Patienten, deren Seren hier untersucht

wurden, verfügten.

Sowohl im Stadium I wie teils noch im frühen Stadium II sind nur in einem geringen Prozentsatz der Fälle Antikörper gegen Cardiolipin, etwas häufiger gegen Pallida, nachweisbar.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe eines käuflichen Gerätes der diskontinuierlichen Analyse-methode ("Braun-Systematik") wurden Teilschritte der Komplement-Bindungsreaktion der Lues-Serologie mit Pallida und Cardiolipin als Antigen mechanisiert. Die KBR wurde wie in der Standardmethode durchgeführt, auf die Braun-Systematik übernommen. Nur die Reaktionsvolumina wurden bei der teilmechanisierten Methode verdoppelt.

Durch die Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Inkubations-, Pipettier- und Ablesevorgänge konnten technische Fehlerquellen minimalisiert werden. Durch die fotometrische Trübungsmessung, welche numerisch mit Datum und Platzcodierung ausgedruckt wird, ist eine Kontrolle ebenso wie gleichzeitig Dokumentation gegeben.

Die KBR kann auf der Braun-Systematik qualitativ wie quantitativ und wie in dieser Studie in der Kälte-Bindung, der sogenannten Kolmer-Technik, durchgeführt werden. Die Teilmechanisierung erbrachte eine Erhöhung der Sensibilität für beide Antigene, Cardiolipin wie Pallida, durch höhere Titernachweise. Die Untersuchung derselben Seren mit dem lues-spezifischen Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper-Absorptions-Test ergab eine geringe Zahl biologisch falsch positiver KB-Reaktionen der teilmechanisierten Methode, was zu einer Erhöhung der Spezifität der BSM reaktiven Seren beitrug. Diese ist zwar erwünscht, steht aber nicht im Vordergrund eines Suchtestes, so daß als wesentlicher Befund der Teilmechanisierung der Lues-KBR die Erhöhung der Sensibilität allein durch die Teilmechanisierung festzustellen ist.

In der KBR reaktive Seren können mit Hilfe der Lues-spezifischen Tests auf Spezifität untersucht werden, wie mit dem Treponema-Pallidum-Haemagglutinationstest: TPHA, dem Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper-Absorptions-Test: FTA-abs, dem IgM-FTA-Test und dem Treponema-Pallidum-Immobilisations-Test: TPI oder Nelson-Test.

VIII. LITERATUR

- 1) Bordet, J.: Annales de l'Institut-Pasteur, 1901, 303-318
"Sur le Mode D' Action des Serums cytolytiques
et sur L' suite de L' Alexine dansum memesérum".
- 2) Bredt, W.: Zeitschrift f. Hygiene 151, 1965, 366-374
"Zur Frage der beim FTA-Test beteiligten
Antigenkomponenten des Treponema pallidum".
- 3) Burkhard, F.: Z. Immunitätsforschung 129, 1965, 382-401
"Zur Standardisierung der Routine-Methodik der
Pallida- u. Cardiolipin-KBR in der Kältebindung".
- 4) Byk-Kurier-Fermotest 1969:
"Die Bedeutung der Pallida-Reaktion für das
lues-serologische Gesamtbild".
- 5) Cacciapuotti, B.: Technicon International Congress, Nov. 1970, New York
"Multichannel System for the Reaktion of prolonged
Complement Fixation".
- 6) Coffey, E. M., Jue, R. F., Bradford, Th. L. L., and Wood, R. M.:
Brit. J. vener. Dis. 46, 1970, 271
"Evaluation for an automated fluorescent
treponemal Antibody Test for Syphilis".
- 7) Deacon, W. E., Falcon, V. H., Harris, A.:
Proc. Soc. Biol. Med. 96, 1957, 477
"A Fluorescent Test for Treponemal Antibodies".
- 8) Ehrmann, G.: Jadassohn, J. Handb. d. Haut- u. Geschlechts-
krankheiten Erg.-Werk VI/2 1962, 471-476
"b, biologisch falsch positive Reaktionsausfälle".
- 9) Elste, G., Krell, L., Bitta, R.:
Derm. Mschr. 155, 1969, 535-545
"Vergleichende serologische Syphilisdiagnostik
mittels klassischer und spezifischer Methoden".
- 10) Eveld, B.: Der Hautarzt 22, 1971, 442-445
"Zur Spezifität des FTA 200-Tests und des
FTA-abs-Tests".
- 11) Gaethgens, W., Otto, A.:
Medizin. Klinik I 1929, 873-875
"Über die Brauchbarkeit eines wässerigen carbo-
lisierten Pallidaantigens für die serologische
Syphilisdiagnostik".
- 12) Garner, M. F. et al.:
Brit. J. vener. Dis. 48, 1972, 470
"Treponema pallidum haemagglutinations Test for
Syphilis, Comparision with the TPI and FTA-abs-Test".

- 13) Glenn, J.H., Turbull, A.R.:
Brit. J. vener. Dis. 47, 1971, 200-203
"Automatisation of the Wassermann complement fixation test using a discret analyzer".
- 14) Hadding, U., Bitter-Suermann, D.:
Deutsches Ärzteblatt 71, 1974, 932-938
"Das Komplementsystem und seine Funktion".
- 15) Hunter, E.F., Norins, L.C., Falcon, V.H., Stout, G.W.:
Bull. Orig. mond. Santé 39, 1968, 873-881
"The Fluorescent Treponemal Antibody absorption Test, FTA-abs-Test" (Development, use and present Status).
- 16) Johnston, N.A.: Brit. J. vener. Dis. 48, 1972, 464
"Neonatal congenital Syphilis-Diagnosis by the absorbed fluorescent treponemal antibody (IgM) Test".
- 17) Kern, A., Barthelms, H.:
Derm. Mschr. 160, 1974, 275-276
"Treponema pallidum Hämagglutinations TPHA-Test".
- 18) Kolmer, J.A.: Am. J. Clin. Path. 12, 1942, 109
The Technic of the Kolmer complement fixation test for Syphilis employing one-fifth amounts of reagents.
- 19) Krell, L., Elste, G., Bitta, R.:
Derm. Mschr. 155, 1969, 545-553
"Erfahrungen mit dem FTA-abs-Test im Vergleich zur übrigen serologischen Syphilis-Diagnostik".
- 20) Krell, L., Kern, A.:
Das Deutsche Gesundheitswesen 26, 1971, 1712-1716
"Zur Beurteilung atypischer Varianten der Ergebnisse in der spezifischen Syphilis-Serologie".
- 21) Lassus, A., Nustakallio, K.K., Ako, K., Puthonen, T.:
Acta path. et microbiol. scandinav, 69, 1967, 612-613
"The order of appearance of Reactivity of treponemal and Lipoidal tests in early Syph."
- 22) Le Clair, R.A., J. of Infectious dis. 123, 1971
"Evaluation of a qualitativ Haemagglutination Test for Antibodies to Treponema pallidum".
- 23) Lockyer, J.W., Brit. J. vener. Dis. 46, 1970, 290-294
"Syphilis screening using the multi channel blood grouping machine".
- 24) Logan, L.C., Cox, P.M.:
Amerl. J. of Clin. Path. 53, 1970, 163-166
"Evaluation of a Quantitativ automated Micro-haemagglutination Assay for Antibodies to Treponema pallidum".

- 25) Luger, A.: Das Medizinische Laboratorium 25, 1972, 225-235
"Neuere Methoden der Syphilis-diagnostik".
- 26) Luger, A., Spendlingwimmer, I.:
Wiener klin. Wschr. 84, 1972, 657-663
"Der Treponema pallidum Hämagglutinations-Test".
- 27) Mackey, D.M., Price, E.V., Knox, J.M., Scotti, A.:
J. of the amer. Medical Assoc. 207, 1969, 1683-1685
"Spezifity of the FTA-abs-Test for Syphilis".
- 28) McGrew, B.E., Stout, G.W., Falcon, V.H.:
Amerk. J. of medical Technology, 34, 1968, 634-643
"Further studies of an automated Flocculation Test for Syphilis".
- 29) Mc Grew, B.E., Lautz Marjorie, A.:
Amer. J. of Medical Technology 36, 1970, 1-7
"Quantitative automated Reagin Test for Syphilis".
- 30) Meigel, W., Tupath-Barniske, R., Schierz, G.:
Ärztl. Lab. 16, 1970, 113-119
"Der Treponemen-Immunfluoreszenzabsorptionstest (FTA-abs). Spezifität und Empfindlichkeit im Vergleich zum Treponemen Immobilisationstest (TPI)".
- 31) Müller, F.: Segerling:
ZBL. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A 220, 1972, 449-498
"Immunologische und enzymchemische Untersuchungen über die Zellwandstruktur von Treponema pallidum".
- 32) Müller, F.: Immunität und Infektion 2, 1974, 194-201
"Kinetik der Immobilisation von Treponema pallidum (Stamm Nichols)".
- 33) Müller, F.: MMW 30, 1967, 1591-1595
"Methodische und immunologische Aspekte der modernen Syphilisserodiagnostik".
- 34) Müller, F.: Deutsches Ärzteblatt 73, 1976, 9-14
"Perspektiven immunologischer Syphilis-Diagnostik".
- 35) Müller, F., Freiberg:
Zschr. Med. Mikrob. u. Immunologie 1967
"Vergleichende Untersuchungen mit dem Pallida-Antigen in der KBR nach Gaethgens und Kolmer".
- 36) Nelson, R.A., Mayer, M.M., Diesendruck, J.A. Euan, J.T.:
J. exp. Med. 89, 1949, 369
"Immobilization of Treponema pallidum in vitro by antibody produced in syphilitic infection".
- 37) O'Neill, P.: Brit. J. vener. Dis. 48, 1972, 460
"IgM class antitreponemal antibody in treated and untreated syphilis".

- 38) Pangborn, M. C. J. *biol. Chem.* 143, 1942, 247-256
"Isolation and Purification of a serologically active phospholipid from beef heart".
- 39) Pugh, V. W., Gaze, R. W. T.:
J. Clin. Path. 19, 1966, 595
"Simultaneous Wassermann Reaktion and Reiter Protein Complement Fixation Test".
- 40) Pugh, V. W., Gaze, R. W. T.:
J. of Clin. Path. 19, 1966, 595-599
"The Reiter Protein complement fixation Test using the Auto-Analyzer".
- 41) Rathlev, T.: Brit. J. ven. Dis. 43, 1967, 181
"Haemagglutination Test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the Serodiagnosis of syphilis".
- 42) Stout, W. G., McGrew, B. E., Falcon, V. H.:
J. of Public Health Laboratories Directors, 26, 1968, 7-14
"Automation in Syphilis Serology".
- 43) Varques, R.: Sonderdruck 478 aus der Symposium-Vortragsreihe
"Automation in der analytischen Chemie 1965",
Technicon GmbH, Frankfurt/Main.
"Die Automatisierung der Komplement-Bindungs-Reaktion und ihre Anwendung bei der Bordet-Wassermannschen Reaktion".
- 44) Wassermann, A., Neisser, A., Bruck:
DMW 32, 1906, 94-95
"Eine serologische Reaktion bei Syphilis".

Anhang

Methodenbeschreibung zur Durchführung der KBR für beide technische Varianten: Handmethode und teilmechanisierte Methode

- 1) Handmethode (HM) In der als Handmethode bezeichneten Durchführung wurde die KBR in sog. 1/4 Dosen angesetzt:
- 250 ul eines 1:5 verdünnten (VBS-Ca/Mg) inaktivierten Patientenserums
- Zugabe von: 250 ul Antigen-Verdünnung
- Zugabe von: 500 ul Komplement-Verdünnung mit einer C'-Verdünnung, die 5 CH₅₀ enthält gegenüber dem Antigen, also abzüglich des C'-Verbrauchs durch das Antigen.
- Inkubation bei: 4° C für 18 Stunden, danach erwärmen auf 37° C.
- Zugabe von: 500 ul EA, anschließend
- Inkubation bei: 37° C für 30 Minuten, dann
- Ablesung: Trübung: = positiv
(C' wurde durch AK verbraucht)
Hämolyse: = negativ
Der Grad der Hämolyse (0 %, 20 %, 50 %, 70 %, 100 %) wird geschätzt und mit -, (+), +, ++, +++ angegeben.

2) teilmechanisierte Methode

- 2₁) Zur Durchführung der tmM werden folgende Geräte benötigt:

Dilustatik-Einheit (DE):	zum Ansaugen und Pipettieren
Erlenmeyerkolben und Wärme-Rührplatte:	für die Reagentien
Transferrier-Einheit (TE):	mit Serunteller Pipettierarm Zusatzzeitgeber

Vorbereitungen zur Ausführung der KBR mit der teilmechanisierten

Methode

- 1) Die Dilustatik (DE) I und II mit VBS-Puffer füllen, den Hub der DE I auf 0,5 ml bei einer 2 ml Bürette einstellen (das ergibt einen Hub von 0,1 ml Serum).
- 2) Den Hub der DE II auf 1,6 ml bei einer 2 ml Bürette einstellen (das ergibt einen Hub von 0,4 ml VBS-Puffer).
- 3) DE II mit VBS-Puffer-Vorrat verbinden.
- 4) Ansaugschlauch von DE I mit dem Pipettierschlauch von DE II koppeln.
- 5) Pipettierschlauch von DE II in den Transferrierarm einführen.
- 6) DE III mit dem Gemisch von Cardiolipinantigen und Komplementverdünnung füllen und
- 7) den Hub von DE III auf 1,5 ml bei einer 5,0 ml Bürette einstellen.
- 8) DE IV mit dem Gemisch von Pallidaantigen und Komplement-Verdünnung füllen.
- 9) Teflonschlauch von DE III bzw. IV in den Zugabearm schieben.
- 10) Auf Position 2 der IE einen Metallreiter anbringen, der die Endabschaltung auslöst.
- 11) Den Probenring der Transport-Einheit (TE) von Position 5 bis 60 mit den Serum-Proben bestücken.
- 12) Probengefäß auf Position 1 mit VBS-Puffer füllen.
- 13) Probengefäß auf Positionen 2, 3, 4 mit verschiedenen Verdünnungen von positiven Kontroll-Seren füllen.
Position 1 dient als negativ-Kontrolle
Positionen 2-4 als positiv-Kontrollen
weitere Kontrollen können an anderen Positionen eingefügt werden.
- 14) Die Position 1 der TE und die Position 1 der IE einander gegenüber justieren.
- 15) Probenring der IE mit leeren Reaktionsgefäßen bestücken.

Beschreibung des Arbeitsablaufes bei der Durchführung der KBR
mittels der teilmechanisierten Methode

A) Das Reaktionssystem Serum-Antigen-Komplement

- 1) Netzschalter DE I drücken
- 2) Dosierknopf DE I drücken
- 3) Netzschalter DE II drücken
- 4) Pipettierschalter DE II drücken
- 5) Netzschalter der TE drücken

DE I saugt aus TE 0,1 ml Patienten-Serum an, überträgt es auf das Reaktionsgefäß der IE, dabei pipettiert DE II 0,4 ml VBS-Puffer in das gleiche Reaktionsgefäß: dabei wird das Patienten-Serum 1 : 5 verdünnt und gleichzeitig der Verschleppungsfehler im Übertragungsschlauch minimalisiert. Das Gerät dreht sich und der Magnetkontakt der IE schaltet DE III bzw. IV ein, wodurch 1,5 ml des Gemisches von Pallida-antigen und Komplementverdünnung zugegeben werden. (Gleiches gilt für das Car-Ag-Komplement-Gemisch).

Nach einmaligem Umlauf des Proben Tellers schaltet der Magnetreiber der TE das Gerät ab.

- 6) der Probenring wird herausgenommen und für 18 Stunden bei 4° C inkubiert.

B) Das Indikator-System

Technische Vorbereitung für die Durchführung des Indikator-System-Schrittes bei der KBR

- 1) Erwärmen der EA im Wasserbad auf 37° C und rühren.
- 2) DE V wird mit dem EA-Gefäß verbunden.
- 3) Der Hub der DE V wird bei einer 5,0 ml Bürette auf 1,0 eingestellt.
- 4) Photometer auf 545 nm stellen.

- 5) Das Datum am Drucker einstellen.
- 6) Die IE ca. 15 Minuten auf 37°C vorheizen.
- 7) Den IE-Probenring 15 Minuten bei 37°C erwärmen, danach
- 8) IE-Probenring in IE einsetzen.
- 9) Saugpumpendruck (-1,5 atm) überprüfen und
- 10) Absaugeempfindlichkeit mittels VBS-Puffer einstellen.
- 11) Die Schlauch-Verbindung Absaugeinheit zu Photometer anschließen.
- 12) Die Schlauchanschlüsse im Magnetventil nach Anleitung anschließen.
- 13) Abgleich des Analog-Digital-Rechners nach Anleitung.
- 14) Codierung vornehmen:

Probenringnummer 1 der TE
muß mit der Ausdrucknummer 1
des Druckes übereinstimmen; dafür

a) Stellung des Entnahmekopfes auf der IE errechnen
(siehe Anleitung),

b) Stellung des Zentraltellers zum rot markierten
Punkt auf TE errechnen (siehe Anleitung).

- 15) Netzschalter der IE drücken.

Arbeitsablauf des Indikatorsystems:

Das EA-System wird durch DE V in Position 1 usw. zugegeben; nach 30-minütiger Inkubation in der IE bei 37°C wird die Position des Absaugekopfes erreicht, dieser eingeschaltet und der Inhalt der Reaktionsgefäße nach Aufrühren in die Photometerküvette abgesaugt.

Mit der ersten Photometerfüllung (negativ-Kontrolle) wird das Gerät arretiert, justiert und die Ablesegenauigkeit überprüft; ebenso wird mit den drei folgenden Kontroll-Seren (positiv-Kontrolle in unterschiedlichen Titern) verfahren (näheres siehe Anleitung der BS).

Der Drucker druckt die gemessenen Größen mit Platzcodierung und Datum aus.

Zeitbedarf:

Für das Serum-Antigen-Komplement-System werden 30 Minuten auf dem Gerät benötigt.

Für das Indikator-System nochmals 45 Minuten.

Pro Durchlauf können, bei einer negativ und drei positiv-Kontrollen 56 Patienten-Seren untersucht werden.

Hierbei kann, wie in dieser Studie, bei einem Durchgang nur jeweils ein Antigen, oder bei Bedarf auch ein doppel-Antigen-Gemisch gleichzeitig in einem Patienten-Serum untersucht werden.

Hinweise auf Fehlerquellen bei der Durchführung der teilmechanisierten
Methode und ihre Ursachen

- 1) Die ausgedruckte Platznummer ist falsch:
 - a) der rote Pfeil ist nicht auf dem richtigen Platz
 - b) Der Entnahmekopf ist um einen Platz verschoben, die Befestigung der Absaugeinheit muß einen Platz vor dem Absaugschlauch sein
- 2) Das Serum wird nicht entnommen:
 - a) der Kolben der Dilustatik I steht nicht in der oberen Stellung
- 3) Der Ansaug- und Pipettierschlauch tropft:
 - a) Der Schlauch ist nicht fest genug eingesteckt
 - b) die Ventilplättchen müssen erneuert werden
- 4) Der Teller läuft weiter, obwohl die Justiertaste gedrückt ist:
 - a) Das Schlauchsystem muß erneuert werden
 - b) Die Einmalspritzen müssen durchgespült werden
 - c) Der Pumpendruck ist falsch eingestellt
 - d) Die Empfindlichkeit muß neu eingestellt werden
- 5) Eigenartig erscheinende, zu niedrig oder ständig wechselnde Photometer-Werte beim Abgleich:
 - a) die Küvette sitzt nicht fest und tief genug im Schacht
 - b) der graue Schlauch ist aus dem Ventil herausgesprungen, dadurch werden die Werte ausgedruckt, bevor sie richtig ausgeschlagen haben.

Lebenslauf

Geboren am 8. 6. 1947 in Neustadt/Haardt, jetzt -/Weinstraße.

Ab 1954 Volksschule in Neustadt/Weinstraße. Am 8. 5. 1956 Tod des Vaters. Von 1957-58 Volksschule in Bamberg. Humanistisches Gymnasium von 1958-63 in Buxheim/Ilser und bis 1968 am Theresianum in Bamberg; dort Abitur am 21. Juli 1968.

Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

Medizinalassistentenzeiten:

4 Monate in der II. Med. Klinik der Universitätskliniken Mainz und je 4 Monate Chirurgie im Kreiskrankenhaus Gerolzhofen und in der Rot-Kreuz-Klinik Würzburg.

Am 31. Juli 1975 Erlangung der Approbation als Arzt.

Seit 1. 9. 1975 Assistent an der Universitäts-Hautklinik Würzburg - Direktor Professor Dr. H. Röckl.

Am 18. 12. 1975 Verheiratung mit Frä. Ingrid K. Schleupen, Medizinalassistentin.

Würzburg, den 3 7. 1976

Karlmann Allert

